

中华蜜蜂囊状幼虫病发病及防治研究进展*

张雪琦^{1, 2, 3**} 孙丽萍³ 赵冬香^{2***} 李继莲^{3***}

(1. 海南大学, 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 海口 571101;

3. 中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093)

摘要 中蜂囊状幼虫病是中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* (简称中蜂) 常见疾病, 其发病可对蜂群造成毁灭性打击, 给中蜂产业造成巨大损失。本文综述了其病症、致病因素及现有的防治方法, 并根据相关中草药的生物活性, 分析中草药防治中蜂囊状幼虫病的可行性和应用潜能, 旨在为中草药有效成分防治中蜂囊状幼虫病的应用提供思路, 为保护中蜂健康、防治中蜂病的发生以及生产安全、无污染的中蜂产品具有重要意义。

关键词 中蜂囊状幼虫病; 中蜂; 中草药; 防治

Progress in research on pathogenic factors of the Chinese sacbrood virus and the potential of Chinese herbal medicine to control this disease

ZHANG Xue-Qi^{1, 2, 3**} SUN Li-Ping³ ZHAO Dong-Xiang^{2***} LI Ji-Lian^{3***}

(1. Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Environment and Plant Protection Institute,

Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China;

3. Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract Chinese sacbrood virus is a common disease of *Apis cerana cerana* that can cause colony collapse and huge losses to the domestic honeybee industry. This paper reviews the symptoms, pathogenic factors and current methods for the prevention and control of this disease, and analyzes the feasibility of using Chinese herbal medicine to prevent and treat it. This analysis is based on the biological activity of Chinese herbal medicine and provides new ideas for the application of active ingredients obtained from this traditional body of knowledge for the prevention and control Chinese sacbrood virus. It is important to protect *Apis cerana cerana* colonies from the Chinese sacbrood virus while at the same time producing safe and pollution-free products.

Key words Chinese sacbrood virus; *Apis cerana cerana*; Chinese herbal medicine; prevention; control

蜜蜂囊状幼虫病 (Sacbrood disease, SBD) 是由囊状幼虫病毒 (Sacbrood virus, SBV) 引起的一种传播迅速且传播范围广的蜜蜂病毒病 (Liu *et al.*, 2010; Pearce, 2014), 1913 年在美国首次发现后 (White, 1913), SBV 感染几乎在世界各地蔓延, 英国、德国、奥地利、印度、韩国、泰国及南非地区等都发现了 SBV 的存在 (Xu *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2013;

Reddy *et al.*, 2016)。SBV 主要侵染 2 日龄的幼虫 (Grabensteiner *et al.*, 2007) 并导致其死亡, 当感染成年蜜蜂时, 不引起发病症状, 但是会缩短其寿命 (Tentcheva *et al.*, 2004)。

1972 年在广东省首次发现中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* (简称中蜂) 被 SBV 感染发病, 将该病命名为中蜂囊状幼虫病 (Chinese sacbrood disease, CSBD, 简称中囊病) (胡影, 2017)。作

*资助项目 Supported projects: 国家蜂产业技术体系 (CARS-44)

**第一作者 First author, E-mail: xueqi15131572033@163.com

***共同通讯作者 Co-corresponding authors, E-mail: dongxiangzh@163.com; bumblebeelj1@hotmail.com

收稿日期 Received: 2020-04-30; 接受日期 Accepted: 2020-06-08

为引起中囊病爆发的最主要因素——中蜂囊状幼虫病毒 (Chinese sacbrood virus, CSBV) 是单股正链 RNA, 单链 RNA 病毒是感染蜜蜂的最大病原体群 (Li *et al.*, 2019), 属于小核糖核酸病毒 (Picornavirus) 和肠道病毒属 (Iflavirus), 为二十面体球状, 无囊膜病毒, 直径为 26-30 nm 的等轴粒子, 传染性软腐病病毒家族 (Chen *et al.*, 2005; Miranda *et al.*, 2010; Blanchard *et al.*, 2014)。CSBV 基因组长 8 863 bp 且包含一个大的编码框 (ORF) (Genbank: HM237361.1), 编码序列的前面是一个 178 bp 长的非编码序列, 在后端有一个 142 bp 长的非编码区域和一个 poly (A) 尾巴。病毒粒子由 3 种结构组成: 病毒衣壳位于最外层, 由 VP1、VP2 和 VP3 组成; VP4 位于中间, 是一层膜, 它与病毒衣壳连接松散, 有许多间隙。病毒核酸 (ssRNA) 是一种球状物质, 位于 VP4 的内侧, 其排列不紧密, 中心为空的, 核酸呈放射状排列, 外侧与 VP4 结合 (Bailey, 1976; Ghosh *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2011)。研究表明, CSBV 衣壳表面润滑, 结构是三维状呈球体形为对称的二十面体, 其中有 132 个孔, 12 个五聚体 (张勤奋等, 2002), CSBV 内部核酸则为二十面体结构依次排序 (冯建勋等, 1998)。感染 CSBV 的中蜂群幼虫的死亡率大幅度上升。本文作者研究得出中蜂其它病原体、寄生虫和气候条件等因素也会增强中囊病感染引起发病的几率 (Li *et al.*, 2012), 严重影响蜂的健康并导致中蜂种群数量的下降。

1 中蜂囊状幼虫病的病症

中蜂囊状幼虫病在春季和秋季发病率较高, 第 1、第 2 龄幼虫最易受感染 (姬聪慧等, 2019)。感染 CSBV 的幼虫因发病而不能进入蛹期, 病变过程中身体颜色从珍珠白逐渐变为淡黄色, 再逐渐变为深褐色; 头部呈钩状, 死后身体逐渐干涸, 形成“龙舟”形状。蜕皮液在表皮积聚, 幼虫呈典型的囊状 (梁勤和陈大福, 2009; 黄少康等, 2010; 刘新宇, 2013; Ma, 2014)。幼虫发病后, 工蜂会不断地将患病幼虫拖出巢穴, 子脾会产生

“花子”现象 (梁勤和陈大福, 2009)。

2 诱发中蜂囊状幼虫病的因素

2.1 病毒感染诱发

病毒感染是中蜂囊状幼虫病暴发的最主要因素, 大部分中蜂囊状幼虫病是由 SBV 感染引起, 电子显微镜下可以观察到许多直径为 26-30 nm 的 SBV 颗粒。病毒粒子从幼虫消化道进入幼虫体内后, 在中肠大量复制增殖, 潜伏 5-6 d 后, 可观察到幼虫表皮开始增厚 (史红霞等, 2019); 研究表明, 一个患病的幼虫可以含有上亿个病毒粒子 (Bailey *et al.*, 1964), 而感染 CSBV 后的成年蜜蜂表现为无明显发病症状, 且体内的病毒可以在蜂群中保持很长一段时间的休眠状态, 甚至可以在蜂群体中越冬 (黄康等, 2008), 但当病毒粒子在蜜蜂体内长时间富集达到一定的浓度时, 就会破坏蜜蜂的中肠黏膜, 引起蜜蜂免疫力下降、寿命缩短 (史红霞等, 2019)。SBV 的侵染可以影响中华蜜蜂的营养代谢, 并且可提高自身免疫反应去应对 CSBV 侵染, 同时, 接种 CSBV 的蜜蜂幼虫发育至预蛹期时发育停滞与死亡, 细胞凋亡水平的显著增加 (郑彬悦等, 2019)。

2.2 应激诱发

SBV 感染的程度受季节性变化的影响, 在春天和秋天囊状幼虫病发生的频率更高 (Tentcheva *et al.*, 2004), 而影响中蜂结肠生产能力的应激源对中蜂囊状幼虫病的致病性有直接影响 (De Miranda *et al.*, 2011)。将幼虫在低温 (20 °C) 下暴露 12-96 h, 然后在 35 °C 下孵育至羽化, 可发现持续低温时间较长会导致较高的死亡率和较短的寿命; 并且在低温胁迫下, 感染 SBV 的 5 龄幼虫的死亡率显著高于感染 SBV 的 2 龄幼虫, 这说明早熟幼虫和晚熟幼虫对冷激的敏感性有差异 (Wang *et al.*, 2016), 说明温度的变化是一个令人担忧的压力源, 会影响蜜蜂中 SBV 感染的流行 (张大利, 2012; Li *et al.*, 2019)。

2.3 螨害的影响

狄斯瓦螨 *Varroa destructor* 是寄生在蜜蜂身

上的一种外寄生螨,它可以感染东方蜜蜂 *Apis cerana* 和西方蜜蜂 *Apis mellifera*, 瓦螨 *Varroa mite* 最初的宿主是东方蜜蜂,逐渐传染至防御力较差的西方蜜蜂(Ai *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012), 对养蜂业来说都是灾难性的存在(Oldroyd, 2007; Martin *et al.*, 2012)。瓦螨通过吸吮成年蜜蜂的血液、孵卵阶段来削弱蜜蜂的生存能力,同时也是多种蜜蜂病毒的载体(Rosenkranz *et al.*, 2010),参与了 SBV 的传播,蜜蜂群体中 SBV 的流行与瓦螨感染水平呈正相关(Tentcheva *et al.*, 2004)。螨害和 SBV 感染的协同效应对蜜蜂的健康产生不利影响(Li *et al.*, 2019)。

3 中蜂囊状幼虫病的防治

3.1 常规防治

中囊病的防控多采用物理防治方法,如从不同蜂群中选择抗性强的蜜蜂,利用营养杂交与抗病育种相互配合的方式,筛选出抗病品种(Bailey *et al.*, 1964);培育优质蜂王替代病态蜂王等(李紫伦等, 2006; 徐书法等, 2011; 张大利, 2012);加强饲养管理,保持强大的蜂群;增加饲养量,以及饲喂食物的种类更贴近自然采食,保证供应的营养充足(张学文等, 2016);同时需要注意温度的保持(曹兰等, 2010);断子清巢,烧病脾;加强蜂群管理,合并弱蜂群等。由于这些处理的效果不理想,不能迅速控制 CSBV 的感染及其在蜂群间的蔓延,遂有养蜂人采用抗生素配以抗病毒药物进行防治以增加疗效,其隐患是导致蜂产品中抗生素等违禁药物的大量残留(罗建能和范一飞, 2003)。近年来,防治蜜蜂囊状幼虫病的其它方法被陆续报道。

3.2 抗体

生物制药中最为重要的一类是制备单克隆抗体药物,单克隆抗体是研发的热点,也将是未来生物制药行业发展的重要动力(新燕, 2016)。单克隆抗体是由单一 B 细胞克隆产生的高度均一、仅对某一特定抗原表位的抗体(张荣波和邹义洲, 2016)。将纯化的 CSBV 免疫 BALB/c 小鼠,可制备抗 CSBV 的单克隆抗体(张鹤,

2018);将灭活的 CSBV 接种母鸡,获得卵黄抗体,对感染 CSBV 蜂群的治疗效果达到 95%-100%(Sun *et al.*, 2018)。抗体疗法虽然有效果,但是对技术的要求高,而且通过抗原的化学处理很容易丢失表位(张荣波和邹义洲, 2016)。

3.3 RNA 干扰

RNA 干扰(RNAi)是一种天然产物,是生物体天然免疫主要机制之一,已经被广泛的运用于各种疾病的治疗(史红霞等, 2019)。通过饲喂 dsRNA 使 CSBV 的 RdRp 下调 85%,取得良好的基因沉默效果(史红霞等, 2019)。Zhang 等(2016)成功制备了以中蜂囊状幼虫病毒 VP1 基因为靶点的 dsRNA 质粒,并在大肠杆菌 HT115(DE3)中进行了表达,将阴离子交换色谱柱纯化的 dsRNA VP1,喂饲感染 CSBV 的 2 龄中华蜜蜂幼虫,可显著降低幼虫死亡率和 VP1 基因表达水平。张鹤(2018)同样选用与 CSBV 主要衣壳蛋白 VP1 相对应的 dsRNA 喂养蜜蜂幼虫,对 CSBV 有明显的抑制作用,保护蜜蜂幼虫免受 CSBV 感染;马跃宇等(2019)研究 siRNA 在 293T 细胞中能抑制 CSBV VP2 蛋白的表达,干扰效果接近 40%,给感染 CSBV 的幼虫饲喂 siRNA,在各时间点幼虫体内 CSBV 拷贝数均低于 CSBV 对照组,且饲喂 siRNA 组的幼虫存活率明显上升,与 CSBV 组有极显著差异。RNAi 的研究对中囊病的防治有广阔的前景,但 RNAi 干扰效率受到 dsRNA 导入方法、靶标区域、dsRNA 长度和在宿主体内的稳定性等诸多因素影响,同时价格昂贵,推广难度大。

3.4 牛乳铁蛋白肽 LfcinB

牛乳铁蛋白肽 LfcinB 是由牛乳铁蛋白经蛋白酶消化后释放的一系列多功能天然活性肽,具有广阔的生物学活性。通过给感染 CSBV 的幼虫饲喂 LfcinB(4-9),可以提高幼虫的存活率,抗病效果最高为 72.02%(曹兰等, 2013)。但对其机理的分析,还没有具体的研究。

3.5 银 Ag

银作为常见的化学元素,通常被用作广谱的

杀生剂。在韩国通过饲喂银离子给感染 SBV 的东方蜜蜂幼虫, 使用银离子饲喂的蜜蜂在 32 d 之前其平均活动和强度保持在一个稳定的范围内, 而没有饲喂银离子感染 SBV 组的平均活动和强度从第 16 天开始急剧下降。结果表明, 用含有银离子的糖浆喂养的幼虫化蛹的数量明显增加, 说明银离子对 SBV 有抑制效果 (Ahn *et al.*, 2015)。但将银离子引入易感蜂群的饲料中, 可能会导致蜂蜜受到污染, 同时长期接触会在人皮肤、肝脏和脾脏等软组织中累积, 最终可能会导致银中毒, 进入到土壤中, 也会导致环境的污染。

虽然上述的方法已大部分成功应用于抗 CSBV 实验方面, 但由于缺乏技术的精准性、昂贵的成本费用和对环境的污染, 导致其在中囊病的防治中未见推广使用。基于此, 开发绿色、有效、廉价的防治方法迫在眉睫。

4 浅析中草药防治中蜂囊状幼虫病的潜能

中国是自然资源丰富的国家之一, 中医药的使用历史悠久, 是世界上最大的天然药物生产基地 (周洪锐, 2012)。中草药是天然产物且功能较为广泛, 具有抗菌、消炎、抗病毒等广泛的药理作用。开发新配方的中草药, 来改善中蜂的健康, 对中蜂囊状幼虫病的预防和治疗具有重要的意义。

4.1 抗菌、抗炎、抗病毒

中草药作为天然产物, 因其具有抑菌、抗炎、抗病毒等功效被广泛应用于多种疾病上, 其中抗病毒药物的研究, 一直受到国内外医药界的普遍重视。贯叶连翘提取物在体外与体内均可以有效抑制猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) (Pu *et al.*, 2009); 板蓝根水提物对 PRRSV 具有显著的直接杀灭作用 (胡梅等, 2006); 黄芪水提物对 PRRSV 具有明显的阻断和抑制作用 (胡梅等, 2006); 且板蓝根、大青叶、虎杖等多种中草药可以抑制多种病毒, 如囊状幼虫病、蜜蜂彩虹病毒等 (江苏新医学院, 1979); 板蓝根抗

病毒作用疗效比较明确, 且能抵抗病毒的种类很多。板蓝根酸性提取物具有较强的直接抑制流感病毒的作用 (石磊等, 2010); 板蓝根各部分在不同质量浓度下均抑制单纯疱疹病毒-I (HSV-I), 且有直接灭活 HSV-I 的作用 (方建国等, 2005), 同时也对人巨细胞病毒 (HCMV) 有抗毒效应 (孙广莲等, 2000)。据报道以大青根为主的中草药制剂对中蜂囊状病有很好的抑制效果, 治愈率和保护率可达到 96.2% 和 100% (易阳等, 1994)。中草药中多酚类物质 (Mihai *et al.*, 2012; Wolska *et al.*, 2016) 和生物碱 (Flesar *et al.*, 2010) 可以帮助蜜蜂对抗感染; 同时多孔蘑菇提取物对 RNA 病毒有一定的抑制效果 (Stamets *et al.*, 2018); 大青叶中 4 (3H) 喹唑酮具有明显的体外抗 H1N1 型流感病毒活性 (许涛等, 2008)。此外, 中草药在抗菌、抗炎方面也有较突出的功效, 金银花、连翘、大青叶、板蓝根等可抑制蜂房链球菌 (罗建能和范一飞, 2003); 金银花、野菊花、连翘等能抑制子囊球菌, 可防止蜂群继发感染 (罗建能和范一飞, 2003)。

4.2 调节免疫

中草药具有调节机体免疫的能力, 可通过服用中草药提高机体的抵抗力。黄芪、当归、湖北山楂按 1:1:1 的质量比例配伍, 可促进罗非鱼的生长、提高免疫应答和抗病能力 (Abarike *et al.*, 2019)。另外, 利用中药九节茶饲喂雄性 C57BL/6 小鼠, 发现可以提高小鼠抗应激能力及改善因应激负荷引起的免疫低下的情况 (何蓉蓉等, 2009), 大青叶水提物有较强的抗流感病毒活性, 其作用机制可能与增强机体免疫力有关 (罗芬, 2017)。目前, 未见通过服用中草药提高蜜蜂免疫的报道。蜜蜂的免疫系统是由自然免疫和获得性免疫组成 (冯峰和魏华珍, 2007)。当病原侵入时, 可依靠增加体液免疫、细胞免疫和非特异性免疫等方式来抵御侵染 (Brogden *et al.*, 2003; Bulet *et al.*, 2003; Gordon *et al.*, 2005), 同时, 蜜蜂脂肪体会产生 4 种抗菌肽: 膜翅目抗菌肽 (Hymenoptaecin)、蜜蜂防卫素 (Defensin)、蜜蜂抗菌肽 (Apidaecin) 和蜂蛾

抗菌肽 (Abaecin) (Casteels *et al.*, 1989, 1990, 1993; Casteels and Tempst, 1994)。不同病原会激活不同的抗菌肽 (Liu *et al.*, 2017), 作者研究发现这 4 种抗菌肽基因在感病蜂和健康蜂间存在显著或极显著差异, 感病蜂免疫基因表达量高于健康蜂, 且在 5 日龄幼虫时期差异最大, 表明 CSBV 促进了蜜蜂体内免疫基因表达 (Liu *et al.*, 2017)。因此, 利用中草药提高免疫力和抗病毒的特性, 在拮抗病毒的同时可提高蜜蜂自身的抵抗力, 调整蜜蜂的机体功能状态, 进行自我修复, 以发挥机体的综合调节能力, 进而抵抗中蜂囊状幼虫病毒的感染, 大幅度降低感染疾病的概率。提高免疫力的做法是符合黄帝内经中所述的“正气存内, 邪不可干”, 只有提高自身免疫力, 才能抵抗病毒的入侵邪。而预防中囊病也是本着中医“治未病”原则, 有病治病, 没病防病的原则。因此, 研制具有抗菌、抗炎、抗病毒及提高免疫力的中草药组方, 对于防止中囊病的发生和发展是可期待的。

5 展望

养蜂业是我国农业生产的重要组成部分。中蜂作为我国本土的蜂种, 是我国特有的种质资源 (张卫星等, 2016)。长期以来, 中蜂以其强大的生命力和抗逆性, 在复杂的地形、低温和潮湿等恶劣的环境条件下, 为山区野生植物授粉发挥着决定性的作用, 同时也是维持生态平衡不可或缺的传粉蜂 (Li *et al.*, 2008)。多年来, 中蜂受到中蜂囊状幼虫病的影响, 造成了种群数量的大幅度减少。同时伴随着抗生素和抗病毒药物的广泛应用, 导致蜂产品中抗生素的残留, 成为制约我国蜂产品出口的主要因素。因此, 选择绿色、无污染的中草药作为化学药物的替代药物, 研制针对中蜂囊状幼虫病特效药物具有广阔的应用前景。

参考文献 (References)

Abarike ED, Jian J, Tang J, Cai J, Yu H, Chen L, 2019. Traditional Chinese medicine enhances growth, immune response, and resistance to *Streptococcus agalactiae* in Nile Tilapia. *Journal of*

Aquatic Animal Health, doi: 10. 1002/aah. 10049.

Ahn AJ, Ahn KS, Suh GH, Noh JH, Kim YH, YOO MS, Kang SW, Shin SS, 2015. Efficacy of silver ions against sacbrood virus infection in the Eastern honey bee *Apis cerana*. *Journal of Veterinary Science*, 16(3): 289–295.

Ai H, Yan X, Han R, 2012. Occurrence and prevalence of seven bee viruses in *Apis mellifera* and *Apis cerana* apiaries in China. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109(1): 160–164.

Bailey L, Gibbs AJ, Woods RD, 1964. Sacbrood viruses of the larval honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology*, 23(3): 425–429.

Bailey L, 1976. Viruses attacking the honey bee. *Advances in Virus Research*, 20: 271–304.

Blanchard P, Carletto J, Siede R, Schurr F, Richard T, Ribière M, 2014. Identification of Kashmir bee virus in France using a new RT-PCR method which distinguishes closely related viruses. *Journal of Virological Methods*, 198(6): 82–85.

Brogden KA, Ackermann M, McCray PB, Tack BF, 2003. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22(5): 465–478.

Bulet P, Charlet M, Hetru C, 2003. Antimicrobial peptides in insect immunity//Ezekowitz RAB, Hoffmann JA(eds.). *Innate Immunity*. Shanghai: Humana Press. 89–107.

Cao L, Dai GR, Luo WH, Wang JP, Ding WL, Ren Q, Shen KF, 2010. Advances of Chinese bee sacbrood. *Journal of Bee*, 30(4): 35–37. [曹兰, 戴荣国, 罗文华, 王介平, 丁武龙, 任勤, 沈克飞, 2010. 蜜蜂囊状幼虫病研究进展. 蜜蜂杂志, 30(4): 35–37.]

Cao L, Dai RG, Wang RG, Ren Q, Cheng S, Shen KF, Ji CH, Luo WH, 2013. Bovine LfcinB (4-9) effects of Chinese bee sacbrood. *Apiculture of China*, 64(3): 29–31. [曹兰, 戴荣国, 王瑞生, 任勤, 程尚, 沈克飞, 姬聪慧, 罗文华, 2013. 牛乳铁蛋白肽 LfcinB (4-9)抗中蜂囊状幼虫病的作用效果研究. 中国蜂业, 64(3): 29–31.]

Casteels P, Ampe C, Jacobs F, Vaeck M, Tempst P, 1989. Apidaecins: Antibacterial peptides from honeybees. *The EMBO Journal*, 8(8): 2387–2391.

Casteels P, Ampe C, Jacobs F, Tempst P, 1993. Functional and chemical characterization of hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Biological Chemistry*, 268(10): 7044–7054.

Casteels P, Ampe C, Riviere L, José van DAMME, Elicone C, Fleming M, Jacobs F, Tempst P, 1990. Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *European Journal of Biochemistry*, 187(2): 381–386.

Casteels P, Tempst P, 1994. Apidaecin-type peptide antibiotics

- function through a nonporeforming mechanism involving stereospecificity. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 199(1): 332–345.
- Chen Y, Pettis JS, Feldlaufer MF, 2005. Detection of multiple viruses in queens of the honey bee *Apis mellifera* L. *Journal of Invertebrate Pathology*, 90(2): 118–121.
- De Miranda JR, Gauthier L, Ribière M, Chen YP, 2011. Honey bee viruses and their effects on bee and colony health//Sammataro D, Yoder JA(eds.). *Honey Bee Colony Health: Challenges and Sustainable Solution*. Boca Raton: CRC Press Taylor&Francis Group. 71–102.
- Fang JG, Tang J, Yang ZQ, Hu Y, Liu YH, Wang WQ, 2005. Effect of radix isatidis against herpes simplex virus type I in vitro. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 36(2): 242–244. [方建国, 汤杰, 杨占秋, 胡娅, 刘云海, 王文清, 2005. 板蓝根体外抗单纯疱疹病毒 I 型作用. *中草药*, 36(2): 242–244.]
- Feng F, Wei HZ, 2007. Prevention and cure of bee's diseases. *Apiculture of China*, 58(12): 22–23. [冯峰, 魏华珍, 2007. 蜜蜂病虫害防治. *中国蜂业*, 58(12): 22–23.]
- Feng JX, Lu XY, Zhang QF, Ma ZW, Zhang JQ, Huang WZ, Zhang XF, 1998. Study on the purification, crystallization and structure of Chinese sacbrood bee virus. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, 17(4): 387–388. [冯建勋, 卢忻英, 张勤奋, 马泽微, 张景强, 黄文忠, 张学峰, 1998. 中蜂囊状幼虫病毒的纯化、结晶与结构研究. *电子显微学报*, 17(4): 387–388.]
- Flesar J, Havlik J, Kloucek P, Rada V, Titera D, Bednar M, Stropnický M, Kokoska L, 2010. In vitro growth-inhibitory effect of plant-derived extracts and compounds against *Paenibacillus larvae* and their acute oral toxicity to adult honey bees. *Vet. Microbiol.*, 145(1/2): 129–133.
- Ghosh RC, Ball BV, Willcocks MM, Carter MJ, 1999. The nucleotide sequence of sacbrood virus of the honey bee: An insect picorna-like virus. *Journal of General Virology*, 80(6): 1541–1549.
- Gordon YJ, Romanowski EG, McDermott AM, 2005. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Current Eye Research*, 30(7): 505–515.
- Grabensteiner E, Bakonyi T, Ritter W, Pechhacker H, Nowotny N, 2007. Development of a multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of three viruses of the honeybee (*Apis mellifera* L.): Acute bee paralysis virus, black queen cell virus and *Sacbrood virus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 94(3): 222–225.
- Han B, Zhang L, Feng M, Fang Y, Li J, 2013. An integrated proteomics reveals pathological mechanism of honeybee (*Apis cerana cerana*) sacbrood disease. *Journal of Proteome Research*, 12(4): 1881–1897.
- He RR, Wang M, Li YF, Dai Y, Duan YH, Yao XS, Kurihara H, 2009. Effects of *Sarcandra glabra* extract on immune activity in restraint stress mice. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 34(1): 100–103. [何蓉蓉, 王敏, 李怡芳, 戴毅, 段莹辉, 姚新生, 栗原博, 2009. 中药九节茶提取物对应激负荷小鼠免疫功能的改善作用. *中国中药杂志*, 34(1): 100–103.]
- Hu M, Cu BA, Zhang HY, Xia PA, Wang XB, Wang YG, Zhao XM, 2006. Antiviral effect of extraction from Chinese herbal medicine on PRRSV in vitro. *Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine*, 25(6): 14–17. [胡梅, 崔保安, 张红英, 夏平安, 王学彬, 王远阁, 赵现敏, 2006. 板蓝根、黄芪等中药活性提取物对猪繁殖与呼吸综合征病毒体外作用的研究. *中兽医医药杂志*, 25(6): 14–17.]
- Hu Y, 2017. Genotyping of Chinese sacbrood virus and comparison of the biological characteristics of its representative strain. Masteral dissertation. Jinzhou: Jinzhou Medical University. [胡影, 2017. 中蜂囊状幼虫病毒基因分型及其代表毒株生物学特性比较. 硕士学位论文. 锦州: 锦州医科大学.]
- Huang K, Zeng ZJ, Yan WY, 2008. A study on selection of *Apis cerana cerana* resistant to Chinese sacbrood disease. *Acta Agriculturae Universities Jiangxiensis*, 30(5): 883–887. [黄康, 曾志将, 颜伟玉, 2008. 中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*)抗中蜂囊病选育研究. *江西农业大学学报*, 30(5): 883–887.]
- Huang SK, Liao SJ, Yao YW, Jing ZX, Liang Q, 2010. Study on the activity of phenoloxidase in the larvae and pupae of worker bees with Chinese sacbrood disease. *Apiculture of China*, 61(7): 20–22. [黄少康, 廖水金, 姚文勇, 荆战星, 梁勤, 2010. 中蜂囊状幼虫病病群工蜂幼虫和蛹的酚氧化酶活性研究. *中国蜂业*, 61(7): 20–22.]
- Ji CH, Zhao HX, Gao LJ, Wang RS, Cheng S, Luo WH, Liu JL, Ren Q, 2019. Production performance and biological characteristics of Chengkou *Apis cerana cerana* during the periods of spring and autumn multiplication. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 565(1): 155–158. [姬聪慧, 赵红霞, 高丽娇, 王瑞生, 程尚, 罗文华, 刘佳霖, 任勤, 2019. 春繁、秋繁阶段城口县中华蜜蜂生产性能及生物学特性分析. *黑龙江畜牧兽医*, 565(1): 155–158.]
- Jiangsu New Medical College, 1979. Dictionary of Traditional Chinese Medicine. Shanghai: Shanghai People's publishing house Press. 395–587. [江苏新医学院, 1979. 中药大辞典. 上海: 上海人民出版社. 395–587.]
- Li HL, Zhang YL, Gao QK, Chen JA, Lou BG, 2008. Molecular identification of cDNA, immunolocalization, and expression of a putative odorant-binding protein from an Asian honey bee, *Apis cerana cerana*. *Journal of Chemical Ecology*, 34(12): 1593–1601.
- Li J, Qin H, Wu J, Sadd BM, Wang X, Evans JD, Peng W, Chen Y, 2012. The prevalence of parasites and pathogens in Asian

- honeybees *Apis cerana* in China. *PLoS ONE*, 7(11): e47955.
- Li J, Wang T, Evans J, Rose R, Zhao Y, Li Z, Huang S, Heerman M, García CR, Banmekea O, Brister JR, Hatcher EL, Cao LF, Hamilton M, Chen Y, 2019. The phylogeny and pathogenesis of sacbrood virus (SBV) infection in European honey bees, *Apis mellifera*. *Viruses*, 11(1): 61.
- Li ZL, Ou X, Hu JJ, 2006. Investigation and control of Chinese Sacbrood disease. *Guangxi Journal of Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 22(6): 276–277. [李紫伦, 欧霞, 胡军军, 2006. 中蜂囊状幼虫病的调查与防治. 广西畜牧兽医, 22(6): 276–277.]
- Liang Q, Chen DF, 2009. Honeybee Protection. Beijing: China Agricultural Press. 2–3. [梁勤, 陈大福, 2009. 北京: 中国农业出版社. 2–3.]
- Liu S, Wang L, Guo J, Tang Y, Chen Y, Wu J, Li J, 2017. Chinese sacbrood virus infection in Asian honey bees (*Apis cerana cerana*) and host immune responses to the virus infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, doi: 10.1016/j.jip.2017.09.006.
- Liu XJ, Zhang Y, Yan X, Han R, 2010. Prevention of Chinese sacbrood virus infection in *Apis cerana* using RNA interference. *Current Microbiology*, 61(5): 422–428.
- Liu XY, 2013. Investigation of CSB in loess plateau and establishment of gradient band PCR. Masteral dissertation. Shanxi: Northwest A&F University. [刘新宇, 2013. 黄土高原中华蜜蜂囊状幼虫病调查研究及梯度条带 PCR 检测方法的建立. 硕士学位论文. 陕西: 西北农林科技大学.]
- Luo F, 2017. Antiviral activity of folium isatidis aqueous extract on influenza A virus. *Journal of Xinxiang Medical University*, 34(10): 881–884. [罗芬, 2017. 大青叶水提物抗甲型流感病毒活性研究. 新乡医学学报, 34(10): 881–884.]
- Luo JN, Fan YF, 2003. Analysis on the mechanism and characteristics of Chinese herbal medicine in the control of bee infectious diseases. *Apicultural Science and Technology*, (5): 29–30. [罗建能, 范一飞, 2003. 浅析中草药防治蜜蜂传染性病害的作用机理和特点. 养蜂科技, (5): 29–30.]
- Ma MX, Li M, Cheng J, Yang S, Wang S, Li P, 2011. Molecular and biological characterization of Chinese sacbrood virus LN isolate. *Comparative and Functional Genomics*, 2011(3): 409386.
- Ma MX, Yin YN, Xu XL, Zhang L, Li YF, Luan ZD, 2013. Genetic characterization of VP1 gene of seven sacbrood virus isolated from three provinces in northern China during the years 2008–2012. *Virus Research*, 176(1/2): 78–82.
- Ma MX, 2014. New insights of sacbrood virus. *Virologica Sinica*, 29(6): 410–413.
- Ma YY, Fei DX, Guo YQ, Jin HK, Zhang XY, Ma MX, 2019. Inhibition of Chinese sacbrood virus replication in *Apis cerana* larvae by RNAi Targeting VP2. *Chinese Journal of Virology*, 35(1): 102–108. [马跃宇, 费东亮, 郭亚茜, 金宏凯, 张溪研, 马鸣潇, 2019. RNAi 靶向 VP2 基因抑制中蜂囊状幼虫病毒在中华蜜蜂幼虫体内复制研究. 病毒学报, 35(1): 102–108.]
- Martin SJ, Highfield AC, Brettell L, Villalobos EM, Budge GE, Powell M, Nikaido S, Schroeder DC, 2012. Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science*, 336(6086): 1304–1306.
- Mihai CM, Mărghițaș LA, Dezmirean DS, Chirilă F, Moritz RFA, Schlüns H, 2012. Interactions among flavonoids of propolis affect antibacterial activity against the honeybee pathogen *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(1): 68–72.
- Miranda JRD, Cordoní G, Budge G, 2010. The Acute bee paralysis virus-Kashmir bee virus-Israeli acute paralysis virus complex. *Journal of Invertebrate Pathology*, doi: 10.1016/j.jip.2009.06.014.
- Oldroyd BP, 2007. What's killing American honey bees? *PLoS Biology*, 5(6): e168.
- Pearce F, 2014. Honeybee trade is hotbed for carrying disease into wild. *New Scientist*, 221(2957): 16.
- Pu XY, Liang JP, Shang RF, Wang XH, Wang ZX, Hua LY, Liu Y, 2009. Influence of *Hypericum perforatum* extract on piglet infected with porcine respiratory and reproductive syndrome virus. *Agricultural Sciences in China*, 8(6): 730–739.
- Reddy KE, Mi SY, Kim YH, Kim NH, Ramya M, Jung HN, Thao le TB, Lee HS, Kang SW, 2016. Homology differences between complete sacbrood virus genomes from infected *Apis mellifera* and *Apis cerana* honeybees in Korea. *Virus Genes*, 52(2): 281–289.
- Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B, 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103 (Suppl. 1): S96–S119.
- Shi HX, Dang XQ, Zhu XL, Ma ZG, Liu YM, Huang YB, Zhou ZY, Xu JS, 2019. RNA Interference against infection by the Chinese sacbrood virus. *Chinese Journal of Virology*, 35(1): 109–117. [史红霞, 党晓群, 朱祥龙, 马振刚, 刘永梅, 黄钰彬, 周泽扬, 许金山, 2019. 中蜂囊状幼虫病毒 RdRp 基因 dsRNA 干扰的研究. 病毒学报, 35(1): 109–117.]
- Shi L, Wan ZM, Dong LJ, Zhao YW, 2010. Effect of extractives of radix isatidis on influenza virus. *Acta Academiae Medicinae CPAF*, 19(9): 689–691. [石磊, 万宗明, 董堃瑾, 赵艳威, 2010. 四种板蓝根提取物抗流感病毒作用实验研究. 武警医学院学报, 19(9): 689–691.]
- Stamets PE, Naeger NL, Evans JD, Han JO, Hopkins BK, Lopez D, Moershel HM, Nally R, Sumerlin D, Taylor AW, 2018. Extracts of polypore mushroom mycelia reduce viruses in honey bees. *Scientific Reports*, 8: 13936.

- Sun GL, Hu ZL, Meng H, Li Y, Wang XL, Liu JH, 2000. Study on anti-human cytomegalo virus effect of radix isatidis by MTT colorimetry. *Journal of Shandong University of TCM*, 24(2): 137–138. [孙广莲, 胡志力, 孟红, 李焱, 王秀丽, 刘菊华, 2000. MTT 法检测板蓝根抗巨细胞毒效应. 山东中医药大学学报, 24(2): 137–138.]
- Sun L, Li M, Fei DX, Diao QY, Wang J, Li LQ, Ma MX, 2018. Preparation and application of egg yolk antibodies against Chinese sacbrood virus infection. *Frontiers in Microbiology*, 9: 1814.
- Tentcheva D, Gauthier L, Zappulla N, Dainat B, Cousserans F, Colin ME, Bergoin M, 2004. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* Mite populations in France. *Applied & Environmental Microbiology*, 70(12): 7185–7191.
- Wang Q, Xu X, Zhu X, Chen L, Zhou SJ, Huang ZY, Zhou BF, 2016. Low-temperature stress during capped brood stage increases pupal mortality, misorientation and adult mortality in honey bees. *PLoS ONE*, 11(5): e0154547.
- White GE, 1913. Sacbrood, a disease of bees. Washington DC: US Department of Agriculture, Bureau of Entomology. 169.
- Wolska K, Górski A, Adamiak A, 2016. Antibacterial properties of propolis. *Postępy Mikrobiol.*, 55: 343–350.
- Xin Y, 2016. Medical Immunology. Beijing: China Medical Science Press. 7. [新燕, 2016. 医学免疫学. 北京: 中国医药科技出版社. 7.]
- Xu P, Shi M, Chen XX, 2009. Antimicrobial peptide evolution in the Asiatic honey bee *Apis cerana*. *PLoS ONE*, 4(1): e4239.
- Xu SF, Zhou T, Hu YY, Song HL, Yang J, Luo QH, 2011. Cloning and phylogeny evolution analysis of scabrood virus gene CSBV-BJ/2010 in Chinese honeybee (*Apis cerana cerana*). *Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science)*, 29(5): 44–48. [徐书法, 周婷, 胡颖颖, 宋怀磊, 杨俊, 罗其花, 2011. 中华蜜蜂囊状幼虫病病毒 CSBV-BJ/2010 基因克隆及序列分析. 上海交通大学学报(农业科学版), 29(5): 44–48.]
- Xu T, Liang JP, Yu SJ, Pu XY, Wang XH, 2008. Effects of 4(3H) quinazolinone from *Isatisindigotica* leaves against Influenza virus H1V1 in vitro. *Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine*, 27(30): 7–9. [许涛, 梁剑平, 余四九, 蒲秀英, 王学红, 2008. 大青叶中 4(3H)喹唑酮体外抗 H1N1 型流感病毒的作用研究. 中兽医医药杂志, 27(30): 7–9.]
- Yi Y, Liu ZA, Yuan DC, Liu QH, 1994. Clinical verification report of Chinese herbal medicine on the control of Chinese scabrood disease. *Hunan Journal of Animal Husbandry & Veterinary medicine*, (2): 35–36. [易阳, 刘正安, 袁达春, 刘奇洪, 1994. 中草药防治中蜂囊状幼虫病的临床验证报告. 湖南畜牧兽医, (2): 35–36.]
- Zhang DL, 2012. Investigation and analysis of the occurrence of Chinese scabrood disease in Liaoning province. *Apiculture of China*, 63(2): 19–21. [张大利, 2012. 辽宁中蜂囊状幼虫病发生情况的调查分析. 中国蜂业, 63(2): 19–21.]
- Zhang H, 2018. Preparation of monoclonal antibody against *saccharomyces cerevisiae* larvirus and establishment of agar diffusion assay. Master dissertation. Jinzhou: Jinzhou Medical University. [张鹤, 2018. 中华蜜蜂囊状幼虫病病毒单克隆抗体的制备与琼脂扩散检测方法的建立. 硕士学位论文. 锦州: 锦州医科大学.]
- Zhang J, Zhang Y, Han R, 2016. The high-throughput production of dsRNA against sacbrood virus for use in the honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae). *Virus Genes*, 52(5): 698–705.
- Zhang QF, Yang YF, Liang YY, Lu XY, Zhang JQ, 2002. Study on structure of the Chinese sacbrood virus' nucleic acid. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, 21(3): 331–334. [张勤奋, 杨艺峰, 梁玉尧, 卢英, 张景强, 2002. 中蜂囊状幼虫病病毒 (CSBV) 核酸的结构研究. 电子显微学报, 21(3): 331–334.]
- Zhang RB, Zou YZ, 2016. Medical Immunology. Beijing: China Medical Science Press. 11. [张荣波, 邹义洲, 2016. 医学免疫学. 中国医药科技出版社. 11.]
- Zhang WX, Hao XP, Qin M, Wang S, Liu CL, Wang HF, Xu BH, 2016. Construction of cDNA libraries and ESTs sequencing of *Apis cerana cerana* workers. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 53(3): 589–594. [张卫星, 郝学鹏, 秦明, 王帅, 刘春蕾, 王红芳, 胥保华, 2016. 中华蜜蜂工蜂 cDNA 文库的构建及 ESTs 测序分析. 应用昆虫学报, 53(3): 589–594.]
- Zhang XW, Yang S, Song WF, Miao CH, Chen SA, Huang XQ, Luo WT, 2016. Prevention and control of Chinese scabrood disease by supplementary feeding of pollen and rubber honey in spring. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 57(12): 2114–2117. [张学文, 杨爽, 宋文菲, 苗春辉, 陈顺安, 黄新球, 罗卫庭, 2016. 春繁期补饲花粉和橡胶蜂蜜对中蜂囊状幼虫病的防控探究. 浙江农业科学, 57(12): 2114–2117.]
- Zheng BY, Zhao BA, Jin X, Duan XY, Huang SK, Li JH, 2019. Effect of sacbrood virus infection on nutritional and immune responses of *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Entomologica Sinica*, 62(9): 1054–1064. [郑彬悦, 赵必安, 金鑫, 段辛乐, 黄少康, 李江红, 2019. 囊状幼虫病病毒感染对中华蜜蜂营养和免疫反应的影响. 昆虫学报, 62(9): 1054–1064.]
- Zhou HR, 2012. Research progress of antiviral effect of Chinese herbal extracts. *Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, (5): 6–8. [周洪锐, 2012. 中草药提取物抗病毒作用的研究进展. 畜牧兽医科技信息, (5): 6–8.]